

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16119

## 大鲵蛙病毒感染大鲵的动态病理损伤及病原的组织分布

刘丹<sup>1</sup>, 耿毅<sup>1</sup>, 汪开毓<sup>1</sup>, 余泽辉<sup>1</sup>, 陈德芳<sup>2</sup>, 欧阳萍<sup>1</sup>, 黄小丽<sup>2</sup>, 牟维豪<sup>1</sup>,  
李亚军<sup>1</sup>

1. 四川农业大学 动物医学院, 四川 温江 611130;

2. 四川农业大学 动物科技学院, 四川 温江 611130

**摘要:** 本研究旨在观察大鲵在大鲵蛙病毒(Chinese giant salamander ranavirus, CGSRV)感染过程中组织的动态病理损伤, 同时定量检测 CGSRV 在组织中的动态分布。对大鲵腹腔注射  $1.0 \times 10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL 的 CGSRV 进行人工感染, 在感染的 0 d, 3 d, 5 d, 7 d, 9 d, 13 d, 16 d 随机采集 3 尾, 取肝、肾、脾、肺、肠、皮肤、肌肉、脑、心脏和胃等组织, 石蜡切片和 HE 染色对 CGSRV 感染大鲵的病理损伤过程进行观察, 采用 SYBR Green qPCR 技术对病毒在组织中的动态分布进行定量研究。组织病理结果表明, CGSRV 感染导致大鲵多组织器官损伤, 其中肝、脾、肾和皮肤肌肉病变严重, 为损伤靶器官, 且在一些损伤的细胞内见嗜碱性或嗜酸性包涵体。感染后 3 d 肝细胞与肾小管上皮细胞变性, 肾间以及肝小叶中央静脉周围淋巴细胞和嗜酸性粒细胞浸润; 感染后 5~7 d 实质性器官变性、坏死, 炎症加重, 胃肠道呈卡他性炎。感染后 9 d 表皮细胞坏死、脱落, 肌纤维变性、坏死。感染后 13~16 d 肝出现广泛变性、坏死与炎症, 脾淋巴细胞数量显著减少, 肾小球渗出性-坏死性炎, 皮肤肌肉呈出血性坏死性炎和实质性心肌炎。SYBR Green qPCR 结果显示, 整个感染进程中各组织 CGSRV 含量呈上升趋势, 不同组织中病毒量为  $2.36 \times 10^3 \sim 1.84 \times 10^9$  copy/mg 组织, 其中肺、肠、肝、脾、肾和皮肤肌肉含量高, 表明 CGSRV 具有广泛的组织分布特征, 但肝、脾、肾、皮肤肌肉为其复制和损伤的靶器官, 且病毒分布量与病理损伤程度呈正相关。

**关键词:** 大鲵; 大鲵蛙病毒(CGSRV); 组织分布; 动态病理损伤; SYBR Green qPCR

中图分类号: S947

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)01-0146-10

大鲵(*Andrias davidianus*)俗称娃娃鱼, 属于两栖纲(Amphibia), 有尾目(Caudata), 隐鳃鲵科(Cryptobranchidae), 大鲵属(*Andrias*), 是现存个体最大的两栖动物, 为中国珍稀、濒危物种, 国家二级保护动物, 已被列入濒危野生动植物种国际贸易公约(CITES 公约)附录 I 中<sup>[1]</sup>。由于大鲵具有极高的营养价值、经济价值和科研价值, 其养殖在中国华中、西南及西北等地区迅速发展, 并逐步形成了适度规模化的地方优势特色产业, 但随着该产业的快速发展, 疾病已成为制约其健康可持续发展的重要因素, 尤其是近年来广泛流行的大鲵虹彩病毒病, 给大鲵养殖造成了严重的影响<sup>[2-3]</sup>。

大鲵蛙病毒(Chinese giant salamander ranavirus, CGSRV), 也称为大鲵虹彩病毒(Chinese giant salamander iridovirus, CGSIV), 属于虹彩病毒科(Iridoviridae)蛙病毒属(*Ranavirus*)的双链 DNA 病毒, 该病毒引起的大鲵虹彩病毒病在我国陕西、湖南、湖北、浙江、广东、福建、江西、甘肃和四川等省大鲵养殖地广泛流行, 感染大鲵主要临床特征表现为皮肤出血、溃疡, 四肢肿胀、溃烂, 头部肿胀, 具有传播快, 发病率与死亡率高等特点。自 2009 年 CGSRV 被发现以来, 相继在病原形态发生学<sup>[4-5]</sup>、基因组学<sup>[6]</sup>、检测技术<sup>[7-9]</sup>、免疫防治<sup>[10-11]</sup>、病理损伤以及病毒感染与宿主相关

收稿日期: 2016-04-08; 修订日期: 2016-05-26.

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2014NZ0027).

作者简介: 刘丹(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为动物病原学与病理学. E-mail: liudanchn@163.com

通信作者: 耿毅(1974-), 教授, 主要从事动物病原学与病理学的教学与研究工作. Email: gengyisicau@126.com

免疫因子表达等方面开展了研究<sup>[3, 12-13]</sup>, 这对明确 CGSRV 的生物学特性、准确诊断与免疫防治有重要的意义。对于 CGSRV 感染大鲵病理损伤组织中病原的定量时空分布, 以及病毒分布量与病理损伤程度相关性还未见报道。本研究采用石蜡切片和 HE 染色技术观察感染过程中组织的动态病理损伤, 同时结合 SYBR Green quantitative real-time PCR (SYBR Green qPCR) 技术定量检测 CGSRV 在组织中的动态分布, 为探讨 CGSRV 感染大鲵后病理损伤发展过程、体内病毒定量动态分布规律及其与疾病发生之间的关系提供资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验动物与主要试剂

CGSRV 由四川农业大学水生动物疾病室提供。健康大鲵体重( $280.3 \pm 20.2$ ) g, 体长( $33.9 \pm 2.3$ ) cm, 购于四川省雅安市某大鲵养殖场。CGSRV 主要核衣壳蛋白(MCP)基因 T 克隆标准质粒由本室提供; SYBR Premix Ex Taq 和 SYBR Green qPCR 通用试剂盒购于大连宝生物工程有限公司; 其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 人工感染与临床症状观察

30 尾健康无感染大鲵于水族箱中暂养 7 d 后, 腹腔注射  $400 \mu\text{L}$   $1.0 \times 10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL CGSRV 病毒液。于水族箱中饲养, 水温( $16 \pm 1$ )℃。感染后每天观察大鲵采食、活动、黏液分泌以及体表症状等。

### 1.3 剖检观察与样品采集

分别在感染的 0 d, 3 d, 5 d, 7 d, 9 d, 11 d, 13 d, 16 d 采样, 每次随机选取 3 尾, 三卡因甲基磺酸盐(MS-222, Sigma, 0.5 g/L)麻醉后, 剖解观察内脏器官变化。观察后迅速采集肝、肾、脾、肺、肠、皮肤肌肉、脑、心脏和胃等组织各两份, 一份放入冻存管中置  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存, 另一份样品放入 10% 中性甲醛溶液固定。

### 1.4 组织病理损伤观察

取出 10% 中性甲醛溶液固定好的组织样本, 经乙醇脱水, 二甲苯透明, 常规石蜡包埋, 切片  $4 \mu\text{m}$ , HE 染色, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察并拍照。

### 1.5 qPCR 检测 CGSRV 组织分布情况

#### 1.5.1 DNA 的提取

取出上述  $-80^\circ\text{C}$  冰箱冻存的组织各 40 mg, 根据文献[4]方法制备组织 DNA, 组织样品经剪碎、研磨后, 转入离心管内加入细胞裂解液和蛋白酶 K, 采用苯酚-氯仿抽提 DNA, 加入适量 TE 溶解, 获得基因组 DNA 于  $-20^\circ\text{C}$  保存。

**1.5.2 qPCR 方法灵敏度测定以及标准曲线的建立** 根据大鲵蛙病毒 MCP 基因片段高保守序列 (GenBank 登录号: HQ684746), 应用 Primer Premier 5.0 软件设计 SYBR Green qPCR CGSRV MCP 片段引物: 上游引物序列 5'-GGTGTGTGCTG GAGGATCA-3', 下游引物序列 5'-ATTGTAGGG GAGGGAGAC GAC-3', T<sub>m</sub> 值为  $60^\circ\text{C}$ , 由上海宝生物工程有限公司合成。由本实验室提供 MCP-T 克隆质粒标准品 DNA 拷贝数为  $6.57 \times 10^{13}$  copy/ $\mu\text{L}$  稀释后分别以  $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^8$  copy/ $\mu\text{L}$  7 个浓度梯度和  $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^8$  copy/ $\mu\text{L}$  6 个浓度梯度进行 qPCR 反应, 测定扩增曲线并建立标准曲线。反应体系  $10.0 \mu\text{L}$  (上下游引物各  $0.4 \mu\text{L}$ 、SYBR Green 5.0  $\mu\text{L}$ 、ROX 0.2  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 3.0  $\mu\text{L}$ 、DNA 模板 1.0  $\mu\text{L}$ ), 循环条件  $94^\circ\text{C}$ , 2 min;  $94^\circ\text{C}$ , 20 s,  $60^\circ\text{C}$ , 20 s,  $72^\circ\text{C}$ , 30 s, 进行 40 个循环, 退火阶段收集荧光。

**1.5.3 组织中 CGSRV 的检测** 以方法 1.5.1 提取的组织 DNA 为模板, 参照 1.5.2 反应体系和反应条件进行 qPCR 反应, 每个反应 3 个重复。根据 Step One Software v2.3 软件建立标准曲线, 计算出每 mg 组织病毒拷贝数。结果以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) 表示, SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

## 2 结果与分析

### 2.1 CGSRV 感染大鲵的临床症状与解剖学特征

感染后 2~3 d 大鲵体表黏液分泌增多; 3~5 d 采食减少, 活动量减少; 6~8 d 食欲废绝, 精神沉郁, 四肢肿胀; 9 d 腹部膨大, 体表皮肤出现白色水泡 (图 1A); 13~16 d 感染大鲵嗜睡, 对外界刺激反应迟钝, 皮肤水泡增多 (图 1B), 甚至破溃, 头部、四肢 (图 1C) 肿大、出血, 少数病鲵口腔上、下颌黏膜充血、出血。剖检发现: 感染后 3 d 肝 (图 1D)、脾、肾肿大, 肺充血; 5~7 d 胃肠道充血, 脾肿大, 局部灶性坏死, 肺出血, 脑膜充血、出血; 9~13 d 腹腔出现腹水, 胃肠道空虚, 脾多灶性坏死 (图 1E), 肾肿大, 点状出血 (图 1F), 心脏扩张肿

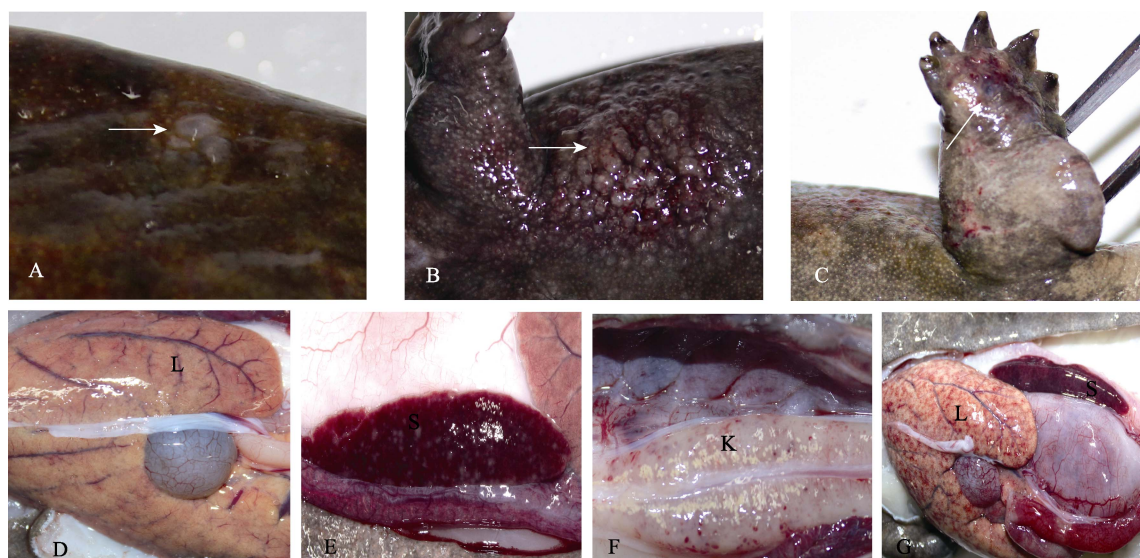


图 1 CGSRV 感染大鲵的临床表现与剖解变化

A. 皮肤出现水泡, 9 d; B. 皮肤水泡增多, 13 d; C. 后肢肿大、出血, 16 d; D. 肝肿大, 3 d; E. 脾多灶性坏死, 13 d; F. 肾肿大, 点状出血, 13 d; G. 肝出血, 16 d. L: 肝; S: 脾; K: 肾.

Fig. 1 Clinical signs and anatomy changes of Chinese giant salamanders infected with CGSRV

A. Raised polyps appeared in the skin, 9 d; B. Number of skin polyps increased, 13 d; C. Swelling and necrosis in posterior limb, 16 d; D. Swelling in liver, 3 d; E. Multifocal necrosis in spleen, 13 d; F. Swelling in kidney with punctate hemorrhage, 13 d; G. Hemorrhage in liver, 16 d. L: liver; S: spleen; K: kidney.

大; 16 d 出现自然死亡, 剖检见含血腹水, 肝出血 (图 1G), 呈花斑状, 胃肠道内充满淡黄色黏稠物。

## 2.2 CGSRV 感染大鲵的组织病理变化

皮肤肌肉: 感染后 5~7 d 皮肤腺细胞与表皮细胞肿胀 (图 2A)。9~13 d 表皮坏死、脱落 (图 2B), 真皮层结构疏松, 其下肌间隙增宽, 肌纤维变性, 肌浆均质红染, 横纹消失, 少量淋巴细胞和嗜酸性粒细胞浸润 (图 2C); 13~16 d 表皮细胞坏死、脱落, 真皮裸露, 甚至坏死形成溃疡, 皮下肌肉溶解, 坏死, 间隙增宽, 出血, 大量淋巴细胞浸润 (图 2D)。

肝: 感染后 3 d 肝细胞肿胀, 颗粒变性, 汇管区及中央静脉周围大量淋巴细胞和嗜酸性粒细胞浸润 (图 2E); 5 d 肝细胞空泡变性, 一些变性的肝细胞胞浆内可见嗜碱性包涵体。7~9 d 肝细胞灶性溶解、坏死 (图 2F); 13~16 d 肝窦淤血、出血, 肝细胞核固缩、碎裂发生坏死 (图 2G), 一些损伤的肝细胞核内见嗜酸性包涵体 (图 2G, 插图) 或胞浆嗜碱性包涵体。

肾: 感染后 3 d 肾小管上皮细胞颗粒变性, 肾间淋巴细胞和嗜酸性粒细胞浸润。5 d 肾小管上皮细胞空泡变性 (图 2H), 管腔内出现红染的蛋白质;

7~9 d 肾小球充血、肿大, 肾小囊间隙增宽, 囊内有一定的蛋白分泌物 (图 2I); 13~16 d 肾小球系膜细胞与血管内皮细胞肿胀、坏死 (图 2J), 胞浆内见嗜碱性包涵体 (图 2J, 插图), 肾小囊内红染的蛋白渗出。

脾: 感染后 3~5 d 脾窦扩张, 淤血, 网状内皮细胞肿胀 (图 2K); 7~9 d 脾出血, 淋巴细胞核浓缩、碎裂, 形成坏死灶, 淋巴细胞减少, 内皮网状细胞增生; 13~16 d 淋巴细胞更为广泛性坏死, 数量显著减少, 红骨髓界限消失, 皮髓内出现大量红染的浆液性渗出物 (图 2L), 一些损伤的细胞浆内见嗜碱性包涵体 (图 2L, 插图)。

胃肠道: 感染后 3~5 d 胃肠道固有层大量淋巴细胞浸润 (图 2M), 7~9 d 肠绒毛顶端上皮细胞局灶性坏死、杯状黏液细胞增多, 胃腺上皮细胞肿胀、坏死; 13~16 d 肠绒毛黏膜下层淤血, 炎症细胞浸润, 黏膜上皮细胞坏死, 脱落, 肠腔内大量坏死脱落的上皮细胞与分泌的黏液, 呈卡他性炎 (图 2N)。

肺: 感染后 5 d, 肺囊毛细血管扩张, 淤血; 7 d 后, 肺囊毛细血管扩张淤血、出血, 肺泡上皮细胞肿胀、脱落 (图 2O), 间质疏松, 淋巴细胞浸润。

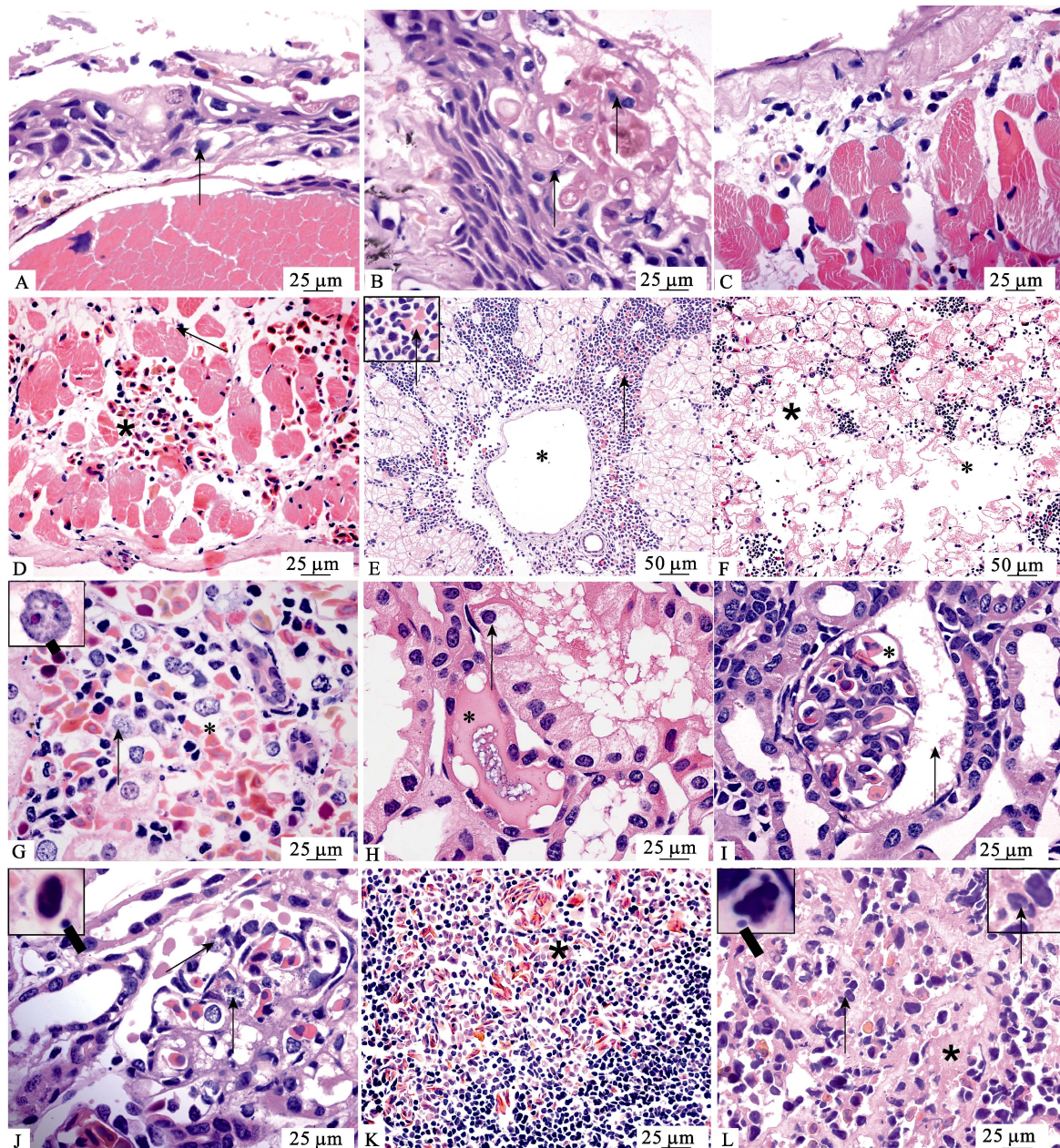
心脏: 感染后 7~9 d 心肌纤维颗粒变性; 13~16 d 心肌纤维均质红染, 灶性溶解, 坏死(图 2P); 肌间隙内大量淋巴细胞浸润, 出现红染的浆液性渗出物。

脑: 感染后 7~9 d, 脑膜毛细血管扩张淤血、出血(图 2Q), 淋巴细胞浸润; 13~16 d, 脑基质水肿, 神经细胞肿胀, 细胞间隙增宽, 部分神经元核固缩, 溶解, 坏死, 小胶质细胞增生(图 2R)。

### 2.3 CGSRV 在感染大鲵体内的动态分布

**2.3.1 扩增曲线以及标准曲线** 标准品质粒梯度稀释后荧光定量 PCR 反应获得扩增曲线(图 3),

从左到右依次为  $1.0 \times 10^8$  copy/ $\mu$ L~ $1.0 \times 10^2$  copy/ $\mu$ L, 阴性没有扩增, 标准品质粒 DNA 样品 PCR 扩增全部为阳性, 即该实时荧光定量 PCR 方法检测下限每个反应体系低于  $1.0 \times 10^2$  copy/ $\mu$ L。以  $1.0 \times 10^3$  copy/ $\mu$ L~ $1.0 \times 10^8$  copy/ $\mu$ L 6 个浓度梯度标准品进行 qPCR 反应, 以质粒拷贝数为横坐标, 以 PCR 反应过程中样品扩增达到域值水平所经历的循环数(CT)为纵坐标制作标准曲线(图 4), 标准曲线的回归系数为 0.999。拷贝数与 CT 值关系:  $CT = -3.286 \lg(\text{拷贝数}) + 36.199$ 。



(待续 to be continued)

(续图 2 Fig. 2 continued)

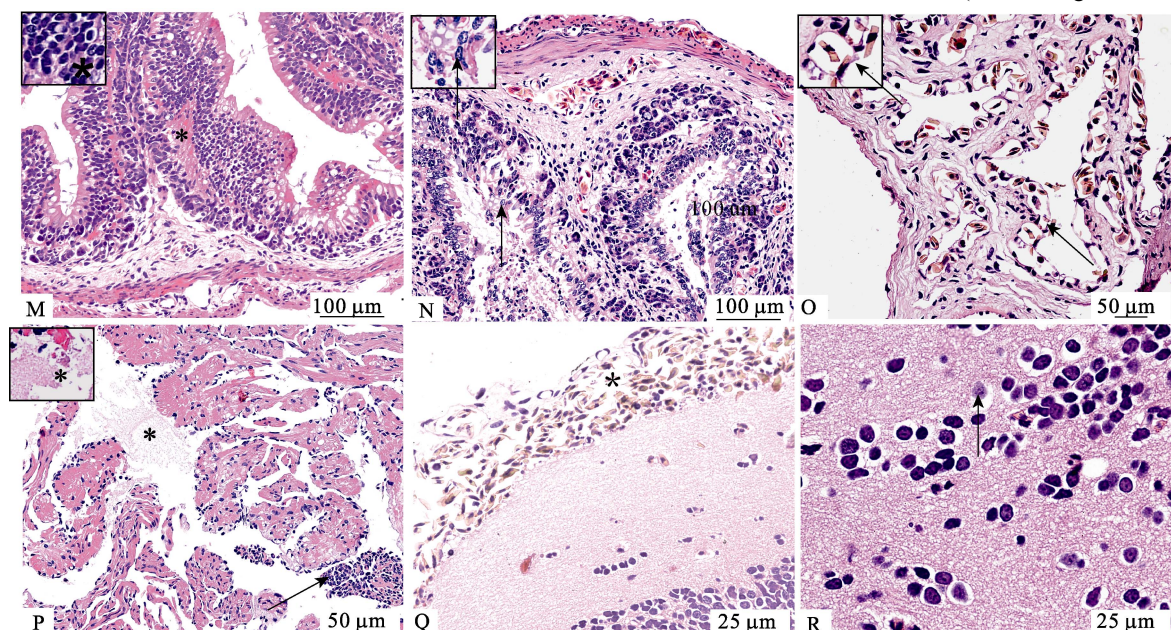


图 2 CGSRV 感染大鲵的组织病理损伤

A. 皮肤表皮细胞肿胀(↑), 5 d; B. 表皮细胞坏死、脱落(↑), 9 d; C. 肌纤维变性, 间隙增宽, 少量淋巴浸润, 13 d; D. 肌纤维坏死(↑), 肌肉出血, 淋巴细胞细胞浸润(\*), 13 d; E. 肝中央静脉(\*)周围大量嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润(↑), 3 d; F. 肝细胞灶性溶解、坏死(\*), 7 d; G. 肝窦淤血、出血(\*), 肝细胞坏死(↑), 肝细胞核内嗜酸性包涵体(插图), 13 d; H. 肾小管上皮细胞空泡变性(↑), 管腔内红染蛋白渗出物(\*), 5 d; I. 肾小球充血(\*), 肿大, 肾小囊内红染蛋白渗出物(↑), 7 d; J. 肾小球系膜细胞(↑)与血管内皮细胞(↖)肿胀、坏死, 胞浆内嗜碱性包涵体(插图), 13 d; K. 脾窦扩张, 淤血(\*), 3 d; L. 脾淋巴细胞广泛性坏死(↑), 浆液渗出(\*), 损伤细胞浆内嗜碱性包涵体(插图), 13 d; M. 肠固有层大量淋巴细胞浸润(\*), 3 d; N. 肠黏膜上皮坏死、脱落(↑), 13 d; O. 肺囊毛细血管扩张淤血、出血(↑), 肺泡上皮细胞肿胀, 7 d; P. 心肌纤维变性、坏死, 肌间隙浆液渗出(\*)与淋巴细胞浸润(↑), 13 d; Q. 脑膜毛细血管扩张淤血、出血(\*), 炎症细胞浸润 7 d; R. 神经细胞核固缩(↑), 小胶质细胞增生, 13 d.

Fig. 2 Histopathological features of *Andrias davidianus* infected with CGSRV

A. Swelling in epidermis cells (↑), 5 d; B. Necrosis, exfoliation of epidermis cells (↑), 9 d; C. Degeneration in muscle fibers, intermuscular space expansion with a little lymphocytes, 13 d; D. Necrosis in muscle fibers (↑), hemorrhage and lymphocytes infiltration in intermuscular space of muscle (\*), 9 d; E. A large number of eosinophils and lymphocytes (↑) around central vein (\*), 3 d; F. Dissolving, focal cytolysis, necrosis in hepatocytes (\*), 7 d; G. Congestion and hemorrhage in hepatic sinus (\*), necrosis in hepatocyte (↑), eosinophilic inclusions (illustration) emerged in hepatocyte nucleus, 13 d; H. Vacuole degeneration in renal tubular epithelial cells, protein-like precipitate in renal tubular. 5 d; I. Hyperplasia and swelling in glomeruli (↑), protein-like precipitate in kidney renal capsule (\*), 7 d; J. Swelling and necrosis in glomerular mesangial cells (↑) and vascular endothelial cells (↖), basophilic inclusions in intracytoplasm (illustration), 13 d; K. Expansion and hyperemia in splenic sinus (\*), 3 d; L. Lymphocytes necrosis (↑), exudation (\*) and basophilic inclusions (illustration) in the spleen 13 d; M. Lymphocytes in the intestine amina propria (\*), 3 d; N. Necrosis, exfoliation of intestinal mucosal epithelia (↑), 13 d; O. Hyperplasia and hemorrhage in lung sac capillaries (↑), alveolar epithelial cells swelling, 7 d; P. Degeneration, necrosis in myocardial fibers, serous (\*) and lymphocyte infiltration in the intermuscular space (↑), 13 d; Q. Congestion, hemorrhage, expansion and inflammatory cells infiltration in meningeal capillaries (\*), 7 d; R. Nerve cell nucleus pycnosis (↑), microglia proliferation in brain, 13 d.

**2.3.2 各组织中 CGSRV 的动态分布** 以感染 CGSRV 后不同时间点大鲵各组织提取的 DNA 为模板进行 SYBR Green qPCR 检测, 0 d 各组织中未检测到病毒存在, 其余时间点检测结果如图 5 所示, 在整个感染过程中所有检测组织中都能检测到 CGSRV, 除脾、肾在感染后 13 d 达最大值后显著性下降( $P<0.05$ ), 其余组织 CGSRV 病毒量呈上升趋势,

其中肝、肠、肺、皮肤肌肉中病毒量在 16 d 分别达峰值  $1.84\times 10^9$  copy/mg、 $4.22\times 10^7$  copy/mg、 $7.25\times 10^8$  copy/mg、 $1.82\times 10^8$  copy/mg, 显著性高于同一组织其他各时间点( $P<0.05$ )。组织嗜性表明, 皮肤肌肉、肺、肝、脾、肾、肠具有较强的组织嗜性, 为病毒增值的重要场所, 胃、脑、心脏等组织嗜性较弱。感染后 3 d 肝病毒量最高为  $1.61\times 10^5$  copy/mg, 7 d 肝、

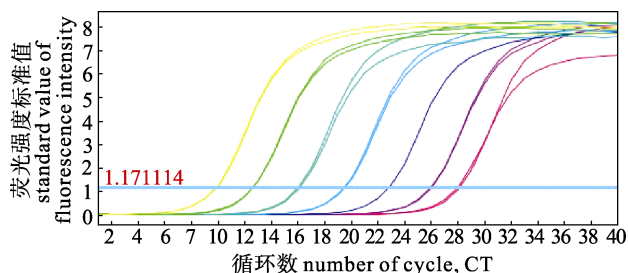


图 3 荧光定量 PCR 灵敏度扩增曲线

从左到右依次为  $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^2$  copy  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  样品扩增曲线。

Fig. 3 Amplification curves of real-time qPCR sensitivity test  
The curves from left to right are amplification on behalf of  $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^2$  copy  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  samples.

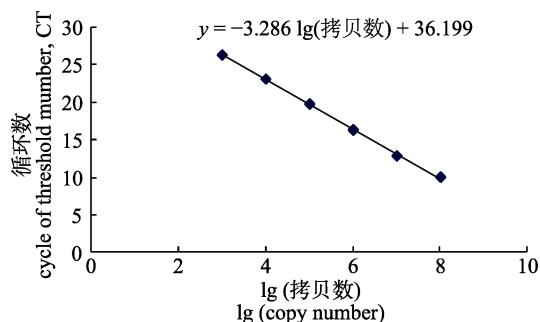


图 4 荧光定量 PCR 扩增标准曲线

以  $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^8$  copy  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  浓度梯度的标准质粒进行标准曲线扩增。

Fig. 4 qPCR amplification standard curves  
Standard plasmids of  $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^8$  copy  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  were used for the amplification of standard curve.

脾、肾、肠、肺和肌肉病毒量持续上升, 其中皮肤肌肉中病毒量  $1.71 \times 10^7$  copy/mg 显著高于其他组

织病毒量( $P < 0.05$ )。13 d 脾、肾、肺病毒量显著性上升, 其中脾病毒量为  $1.04 \times 10^9$  copy/mg, 显著高于其他组织病毒量( $P < 0.05$ )。16 d, 多数组织病毒量升高, 其中肝、皮肤肌肉、肺和肠含量高, 为  $4.22 \times 10^7 \sim 1.84 \times 10^9$  copy/mg。此时, 脾、肾病毒量显著降低( $P < 0.05$ ), 但仍维持在  $10^6$  拷贝数水平。胃、脑、心脏病毒量为  $2.36 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^5$  copy/mg, 显著低于其他组织( $P < 0.05$ )。取同一组织所有时间点总的病毒拷贝数的算术平均值进行分析, 结果表明(图 6), 肝、皮肤肌肉、脾、肺等病毒量高达  $10^7 \sim 10^8$  数量级, 较其他组织至少高出 1~2 个数量级( $P < 0.05$ ), 肠和肾病毒为  $10^6$  数量级水平, 而胃、脑、心脏等组织病毒量显著低于其他组织( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

蛙病毒(*Ranavirus*)属虹彩病毒科(Iridovirus), 是一类可感染鱼类、两栖类和爬行类等不同物种的 DNA 病毒。自 1966 年 Granoff 等<sup>[14]</sup>首次分离到蛙病毒以来, 世界各地相继暴发蛙病毒病<sup>[15]</sup>。现已发现, 蛙病毒能感染 52 个变温脊椎动物家族的 175 种动物, 除南极洲外, 其余各大洲均有蛙病毒感染致死的相关报道<sup>[16]</sup>, 因此, 蛙病毒又被称为“冷血动物杀手”。鉴于蛙病毒的严重危害性 OIE 已将蛙病毒感染列入法定报告的疾病名单。CGSRV 作为蛙病毒属的一个成员, 是近年来新发现的一种严重危害养殖大鲵的病原, 现已在中国

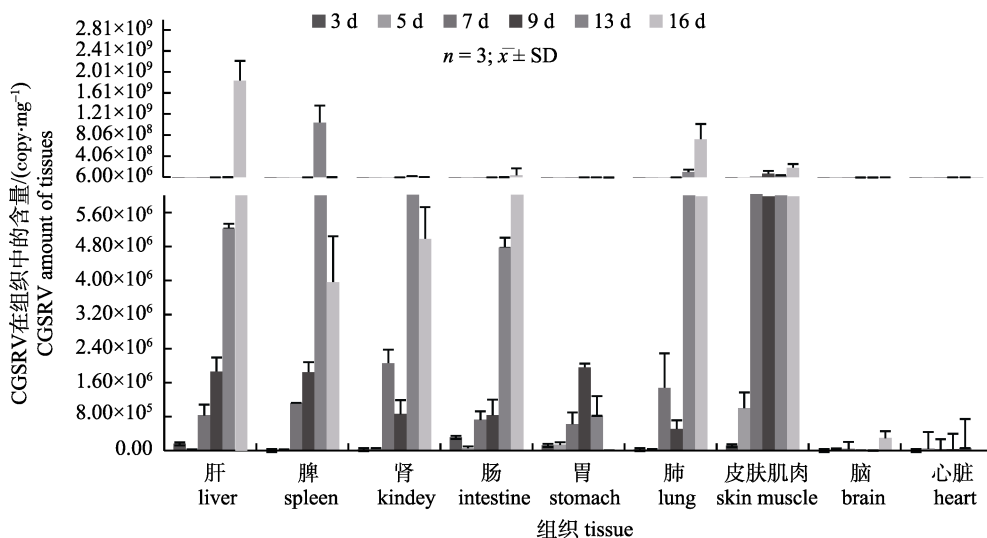


图 5 CGSRV 在组织中的动态分布情况

Fig. 5 Dynamic distributions of CGSRV in tissues

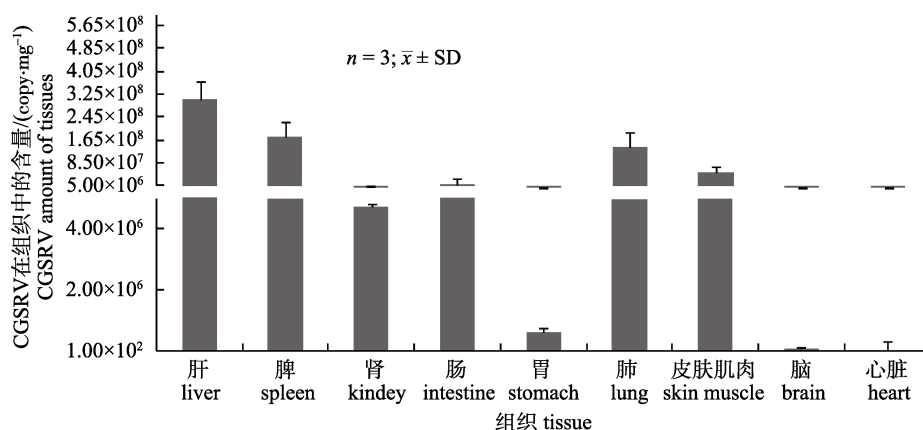


图 6 CGSRV 感染大鲵的组织嗜性

纵坐标表示 CGSRV 感染大鲵后各组织所有时间点病毒拷贝数的平均值。

Fig. 6 The tissue tropism for Chinese giant salamander challenged with the CGSRV

The average of copies of all the time point from each tissue after infected with CGSRV were used.

大鲵养殖区广泛流行,其自然感染出现食欲减退,活动减少,精神沉郁,头部与四肢肿胀,体表出血、溃疡,肝、脾、肾肿大与腹水等临床表现与剖检特征。本研究以  $1.0 \times 10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL 浓度的 CGSRV 腹腔注射感染大鲵后也表现出与自然感染一致的临床表现与剖检特征,其中头部与四肢肿胀,皮肤出血、溃疡,肝、脾、肾肿大与出血的病变特征在感染大鲵中较为一致,可以作为 CGSRV 感染大鲵临床诊断的示病症状<sup>[3, 17]</sup>。

组织病理损伤表明 CGSRV 能引起大鲵多组织器官损伤,肝、脾、肾和皮肤肌肉等病变严重,是 CGSRV 感染的主要靶器官,且在一些损伤的细胞内见嗜碱性或嗜酸性包涵体。感染早期(3~5 d),主要表现为肝中央静脉周围和胃肠固有层组织嗜酸性粒细胞和淋巴细胞等浸润,肝细胞颗粒与空泡变性,脾网状内皮细胞增生、变性坏死,肾小管上皮细胞颗粒变性与坏死。感染中期(7~9 d),肝、脾、肾等实质性器官变性与灶性坏死,炎症反应更为明显,皮肤表皮细胞坏死脱落,肌纤维变性,溶解坏死,肺囊上皮细胞肿胀、坏死。感染后期(13~16 d),肝、脾、皮肤肌肉和肾等器官的损伤表现出更为广泛的变质性损伤和严重的炎症反应,其病理组织损伤特点与 CGSRV 自然感染大鲵的病理损伤一致<sup>[5, 17]</sup>,但本研究进一步明确了 CGSRV 感染与病理损伤的发展过程,上述特征性病理损伤与损伤细胞内包涵体的出现可作为 CGSRV 感染大鲵的组织病理诊断指标。肝与肾在体内水钠

代谢与平衡中有重要的作用,由于它们在感染过程中的渐进性损伤,导致器官功能的障碍,甚至衰竭,造成体内水钠调节失衡,而致感染大鲵多组织器官水肿,表现出腹水、头部与四肢肿胀等临床表现。感染大鲵脾脏表现出明显的淋巴细胞消耗,淋巴细胞数量随感染时间的延长而逐渐减少,导致机体免疫功能低下<sup>[18]</sup>,同时感染大鲵皮肤肌肉也表现出明显的损伤,甚至形成开放性的溃疡<sup>[17]</sup>,致大鲵皮肤分泌抗菌肽、免疫球蛋白、IFN 诱导蛋白与 MHC I 等抗菌物质和免疫相关因子功能受损<sup>[13, 19]</sup>。由于皮肤、脾等器官的损伤,感染大鲵抵抗力下降,这为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、不动杆菌(*Acinetobacter* spp.)与假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)等条件致病菌的继发感染创造了条件,从而加重病情,加速感染大鲵的死亡。这也可能是早期对该病的病因研究中常常分离到嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、不动杆菌(*Acinetobacter* spp.)与荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)等条件致病菌<sup>[20-22]</sup>的原因。

蛙病毒病是危害水生动物最严重的病毒性疾病之一,为阐明其致病机理,国内外学者相继开展了蛙病毒感染后各组织器官中病毒的分布情况的研究。谢简等<sup>[23]</sup>利用免疫组化技术对蛙虹彩病毒(*Rana grylio virus*, RGV)感染沼泽绿牛蛙(*Rana grylio* Stejneger)后病毒的组织分布情况进行了研究,结果发现 RGV 具有广泛的组织嗜性,肺、肠、肝、脾、肾为病毒复制的重要靶器官,心脏中有

少量分布, 而其他组织没有进行病毒分布的检测。Jiang 等<sup>[12]</sup>利用原位杂交技术研究表明, 大鲵虹彩病毒(CGSIV)在感染大鲵肝、脾、肾、肠中含量丰富, 皮肤和心脏中没有检测到阳性信号, 对于肺、胃、脑等组织没有进行相应的研究。Balseiro 等<sup>[24]</sup>研究发现, 产婆蟾蛙病毒(common midwife toad virus, CMTV)在感染蝾螈(*Mesotriton alpestris cyreni*)和产婆蟾(*Alytes obstetricans*)的皮肤中存在少量分布。综上表明, 蛙病毒具有广泛的组织嗜性, 其中肝、脾、肾、肺、肠为病毒复制的重要靶器官。本研究利用 SYBR Green qPCR 方法发现在整个感染过程中皮肤肌肉、肺、肠、肝、脾、肾、胃、心脏、脑等组织中都能检测到 CGSRV, 随着疾病发展各组织中 CGSRV 病毒含量呈上升趋势, 其中肺、肠、肝、脾、肾和皮肤肌肉中病毒量高, 在  $4.77 \times 10^6 \sim 1.84 \times 10^9$  copy/mg 范围, 表明这些器官是 CGSRV 病毒复制的重要靶器官, 且 CGSRV 具有更广泛的组织嗜性, 这种差异可能与毒株和宿主的种类以及检测方法有关。组织病理显示肝、脾、肾、皮肤肌肉等损伤严重, 为损伤的重要靶器官, 这些与组织器官中的病毒量呈正相关关系。另外, 肺与肠的病毒含量也较高, 但其组织损伤并不是特别严重, 表明这两个器官不是 CGSRV 病毒损伤的靶器官, 但可能是病毒复制与储存的部位, 但其一定程度的病理损伤为病毒向外散播创造了条件, 因此, CGSRV 可能与 FV3 相似, 在感染动物体内增殖后可通过皮肤、消化道与呼吸道向外界散毒<sup>[25-26]</sup>, 对于其具体的散毒机制还需要进一步的研究以明确 CGSRV 的扩散与传播机制, 为更有效的防控其对养殖大鲵的危害提供参考。

#### 参考文献:

- [1] Zhang K J, Wang X M, Wei W U, et al. Advances in conservation biology of Chinese giant salamander[J]. Chin Biodivers, 2002, 10(3): 291-297.
- [2] Geng Y, Wang K Y, Zhou Z Y, et al. First report of a *Ranavirus* associated with morbidity and mortality in farmed Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*)[J]. J Comp Pathol, 2011, 145(1): 95-102.
- [3] Meng Y, Ma J, Jiang N, et al. Pathological and microbiological findings from mortality of the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. Arch Virol, 2014, 159(6): 1403-1412.
- [4] Geng Y, Wang K Y, Li C W, et al. PCR detection and electron microscopic observation of bred Chinese giant salamander infected with ranavirus associated with mass mortality[J]. Chinese Veterinary Science, 2010, 40(8): 817-821. [耿毅, 汪开毓, 李成伟, 等. 蛙病毒感染致养殖大鲵大规模死亡的电镜观察及 PCR 检测[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(8): 817-821.]
- [5] Zhou X Y, Zhang X L, Ji H, et al. Morphology of *Andrias davidianus* iridovirus and characterization of its inclusion bodies[J]. Freshwater Fisheries, 2015, 45(1): 62-66. [周小愿, 张星朗, 吉红, 等. 大鲵虹彩病毒的形态结构及其包涵体特征[J]. 淡水渔业, 2015, 45(1): 62-66.]
- [6] Wang N, Zhang M, Zhang L, et al. Complete genome sequence of a ranavirus isolated from Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. Genome Announc, 2014, 2(1): e01032-13.
- [7] Zhou Y, Zeng L B, Meng Y, et al. Establishment of a TaqMan real-time PCR assay for detecting the giant salamander iridovirus[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(5): 772-778. [周勇, 曾令兵, 孟彦, 等. 大鲵虹彩病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 水产学报, 2012, 36(5): 772-778.]
- [8] Li J Y, Wang S Y, Wang S, et al. Development of multiplex real-time PCR assay for detection of ranaviruses[J]. Chinese High Technology Letters, 2015, 25(7): 746-752. [李江宇, 王树云, 王姝, 等. 蛙病毒三重荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 高技术通讯, 2015, 25(7): 746-752.]
- [9] Geng Y, Liu X X, Zhou Y, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP) for rapid detection of Chinese giant salamander *Ranavirus*[J]. Asian Herpetol Res, 2015, 6(1): 59-65.
- [10] You X L, Nie D S, Qin H X, et al. Cloning and characterization of immune molecule CD9 homolog in Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 31(4): 397-407. [尤修玲, 聂东宋, 秦华夏, 等. 大鲵免疫分子 CD9 的克隆与鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(4): 397-407.]
- [11] Zeng X H, Zeng L B, Zhou Y, et al. Construction and immune efficacy of an MCP-containing DNA vaccine for Chinese giant salamander iridovirus[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(5): 1055-1067. [曾宪辉, 曾令兵, 周勇, 等. 大鲵虹彩病毒主衣壳蛋白 MCP 基因 DNA 疫苗的构建及其免疫效果[J]. 中国水产科学, 2015, 22(5): 1055-1067.]
- [12] Jiang N, Fan Y, Zhou Y, et al. Characterization of Chinese giant salamander iridovirus tissue tropism and inflammatory

- response after infection[J]. Dis Aquat Organ, 2015, 114(3): 229–237.
- [13] Zhu R, Chen Z Y, Wang J, et al. Thymus cDNA library survey uncovers novel features of immune molecules in Chinese giant salamander *Andrias davidianus*[J]. Dev Comp Immunol, 2014, 46(2): 413–422.
- [14] Granoff A, Came P E, Breeze D C. Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*: the isolation and properties of virus from normal and tumor tissue[J]. Virology, 1966, 29(1): 133–148.
- [15] Lesbarrères D, Balseiro A, Brunner J, et al. Ranavirus: past, present and future[J]. Biol Lett, 2011, 8(4): 481–483.
- [16] Duffus A L J, Waltzek T B, Stöhr A C, et al. Distribution and Host Range of Ranaviruses[M]// Ranaviruses. Springer International Publishing, 2015: 9–57.
- [17] Geng Y, Wang K Y, Li C W, et al. Pathological changes of cultured Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*) naturally infected with ranavirus[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2011, 31(11): 1640–1644. [耿毅, 汪开毓, 李成伟, 等. 养殖大鲵蛙病毒自然感染的病理形态学观察[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(11): 1640–1644.]
- [18] Gray M J, Miller D L, Hoverman J T. Ecology and pathology of amphibian ranaviruses[J]. Dis Aquat Organ, 2009, 87(3): 243–266.
- [19] Geng X, Wei H, Shang H, et al. Proteomic analysis of the skin of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. J Proteom, 2015, 119: 196–208.
- [20] Miller D L, Rajeev S, Gray M J, et al. Frog virus 3 infection, cultured American bullfrogs[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(2): 342–343.
- [21] Yu Z, Jiang H, Zhong L, et al. Isolation and identification of pathogenic bacteria from giant salamander with bacterial infection syndrome and drug sensitivity analysis[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2013, 35(6): 74–79. [于喆, 江辉, 钟蕾, 等. 大鲵细菌性感染综合症的病原分离与药敏试验分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2013, 35(6): 74–79.]
- [22] Du Z J, Huang X L, Deng Y Q, et al. Isolation and identification of *Pseudomonas fluorescents* from *Andrias davidianus*[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2011, 29(1): 103–107. [杜宗君, 黄小丽, 邓永强, 等. 人工养殖大鲵病原荧光假单胞菌的分离鉴定[J]. 四川农业大学学报, 2011, 29(1): 103–107.]
- [23] Xie J, Li Z Q, Zhang Q Y, et al. Detection of *Rana grylio* virus (RGV) in host frog tissues by using immunohistochemistry assay[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2002, 26(5): 438–443. [谢简, 李正秋, 张奇亚, 等. 免疫组化法检测美国青蛙组织中的蛙虹彩病毒[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 438–443.]
- [24] Balseiro A, Dalton K P, Cerro A D, et al. Outbreak of common midwife toad virus in alpine newts (*Mesotriton alpestris cyreni*) and common midwife toads (*Alytes obstetricans*) in northern Spain: a comparative pathological study of an emerging ranavirus[J]. Vet J, 2010, 186(2): 256–258.
- [25] Robert J, Morales H, Buck W, et al. Adaptive immunity and histopathology in frog virus 3-infected *Xenopus*[J]. Virology, 2005, 332(2): 667–675.
- [26] Jacques R, Erica G, Francisco D J A, et al. Waterborne infectivity of the *Ranavirus* frog virus 3 in *Xenopus laevis*[J]. Virology, 2011, 417(2): 410–417.

## Dynamic pathological lesions and tissue distribution of Chinese giant salamanders infected with CGSRV

LIU Dan<sup>1</sup>, GENG Yi<sup>1</sup>, WANG Kaiyu<sup>1</sup>, YU Zehui<sup>1</sup>, CHEN Defang<sup>2</sup>, OUYANG Ping<sup>1</sup>, HUANG Xiaoli<sup>2</sup>, MOU Weihao<sup>1</sup>, LI Yajun<sup>1</sup>

1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China;

2. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China

**Abstract:** Chinese giant salamander ranavirus (CGSRV) is a new pathogen that has been identified recently in cultured Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*) and is causing serious damage associated with high morbidity and mortality. In this study, Chinese giant salamanders were infected with an intraperitoneal injection of CGSRV at a concentration of  $1.0 \times 10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL. Liver, spleen, kidney, lung, intestine, stomach, skin, muscle, heart, and brain were collected 0 d, 3 d, 5 d, 7 d, 9 d, 13 d, and 16 d after infection for pathological and tissue tropism examinations. Paraffin sections and hematoxylin and eosin staining were used for the histopathological observations, SYBR Green quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed to examine the dynamic quantitative distribution and tissue tropism of CGSRV. The histopathological examination revealed extreme lesions caused by CGSRV in many tissues and organs, particularly in the liver, spleen, kidney, muscle, and skin, and basophilic or eosinophilic inclusions appeared in damaged cells. Hepatocytes and renal tubular epithelial cells had degenerated 3 d after infection, and eosinophils and lymphocytes had infiltrated the renal interstitial and central veins of hepatic lobules. Degeneration, necrosis, and inflammation progressed in parenchymatous organs, and catarrhal inflammation was observed in the gastrointestinal tract after 5–7 d. Necrosis, exfoliation of the epidermis, and degeneration and necrosis of muscle fibers were detected after 9 d. Degeneration, necrosis, and inflammation were extensive in the liver, the number of lymphocytes decreased remarkably, glomerulonephritis with exudation and necrosis was detected in the kidney; hemorrhaging, necrosis and infiltration of inflammatory cells was detected in the skin and muscle, and myocarditis was observed in the heart after 13–16 d. The SYBR Green qPCR results indicated that the number of CGSRV tissue copies increased to  $2.36 \times 10^3$ – $1.84 \times 10^9$  copies/mg tissue during infection. The number of copies was higher in lung, intestine, liver, spleen, kidney, skin and muscle, indicating that CGSRV has a broad tissue distribution and that the liver, spleen, kidney, skin, and muscle were target organs for viral replication and damage. A positive correlation was observed between the quantity of virus and pathology.

**Key words:** *Andrias davidianus*; Chinese giant salamander ranavirus (CGSRV); tissue distribution; dynamic pathological lesions; SYBR Green qPCR

**Corresponding author:** GENG Yi. E-mail: gengyisicau@126.com